

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-154700
(43)Date of publication of application : 14.06.1990

(51)Int.Cl. C12Q 1/68
C07H 21/04
C12Q 1/04
// C12Q 1/10
G01N 33/569
G01N 33/60

(21)Application number : 01-173882 (71)Applicant : IRE MEDGENIX SA
(22)Date of filing : 05.07.1989 (72)Inventor : MOUREAU PHILIPPE
DERCLAYE ISABELLE
DELOR ISABELLE
CORNELIS GUY

(30)Priority
Priority number : 88 8809076 Priority date : 05.07.1988 Priority country : FR

(54) NUCLEIC ACID PROBE USEFUL FOR SPECIFIC DETECTION OF DIFFERENT BACTERIAL SPECIES OF GENUS CAMPYLOBACTER

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a probe for the specific detection of bacterial species belonging to the genus *Campylobacter* by preparing a DNA or RNA nucleic acid probe composed of a recognized characteristic sequence of DNA or RNA.

CONSTITUTION: This nucleic acid probe is a DNA or RNA nucleic acid probe composed of a recognized characteristic sequence of respective DNA or RNA sequence and useful for the specific detection of bacterial species of the genus *Campylobacter*. The selective detection and identification of the bacterial infection with *Campylobacter coli* or *jejuni* are carried out by using two kinds of probes having specificity to *C.coli* and *C.jejuni*, respectively, and separately forming hybrids with the complementary DNA sequence or the complementary RNA sequence belonging to the species to be identified and optionally modified when the sequence has a double-stranded structure in the initial state.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑯ 日本国特許庁 (JP)

⑰ 特許出願公開

⑯ 公開特許公報 (A) 平2-154700

⑯ Int. Cl. 5

C 12 Q 1/68
C 07 H 21/04
C 12 Q 1/04

識別記号

ZNA A
B

府内整理番号

6807-4B
7822-4C
6807-4B※

⑯ 公開 平成2年(1990)6月14日

審査請求 未請求 請求項の数 13 (全16頁)

⑯ 発明の名称 カンピロバクター属の異なる細菌種を特異的に検出するために有用な核酸プローブ

⑯ 特 願 平1-173882

⑯ 出 願 平1(1989)7月5日

優先権主張 ⑯ 1988年7月5日 ⑯ フランス(FR)⑯ 8809076

⑯ 発明者 フィリップ ムロー ベルギー国ショーモン - ギストワー、リュ、デ、セベンヌ、12

⑯ 出願人 イエルエ・メドジエニ ベルギー国フラーレス(番地なし)
ツクス、ソシエテ、アノニム

⑯ 代理人 弁理士 佐藤 一雄 外2名
最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

カンピロバクター属の異なる細菌種を特異的に検出するために有用な核酸プローブ

2. 特許請求の範囲

1. 各々DNA又はRNA核酸の特徴的配列からなるDNA又はRNA核酸プローブであって、上記配列が標識されており、カンピロバクター属の細菌種の1つを特異的に検出するために有用であることを特徴とするプローブ。

2. カンピロバクター・コリ種に特異的な、請求項1に記載のプローブ。

3. カンピロバクター・ジェジュニ種に特異的な、請求項1に記載のプローブ。

4. 下記B 2 6 7配列:

10 20 30 40 50
GAYCAYCACC AAAAAACAGCY XXXXXXXXXXXX XAXXXAXACC AAYXXCCXXA
60 70 80 90 100
GCAXXGCGCA AXXGCACAGG AGCICCGXGA ACCAAAGGAA AAXXGGCAGX
110 120 130 140 150
GAXXXCXXXX GCXXXXXXGG CAXXAXCAGG AGXAAAGGGA CGCAXCGAAA
160 170 180 190 200
CAACCAXXXX ACCGCXAAAA ACXCCXACAG XXXXGCAAGC AAXAXXGGGXX
210 220 230 240 250
TAXATACACGG GCACAXXGCA XXXAXXGCGXA AXAXGXCXCA XXXCYXAAGCC
260
XXXXXCAAGX AAGCXXX

(DNA配列の場合 X = T :

RNA配列の場合 X = U)

又は一方でX及びAかつ他方でC及びGを交換することによる相補的配列から誘導されるDNA又はRNA核酸配列を含む、請求項2に記載のプローブ。

5. 下記B 8 1配列:

10 20 30 40 50
AAGCXXACGA XAXAAGCGAG XAXXAXAAGC AXGAXXXGAX AGGXXXXXXA
60 70 80
CXGGGYYGYX GCXXXXXX XXX XGAAGGAAGCY X

特開平2-154700 (2)

(D N A 配列の場合 X = T ;
R N A 配列の場合 X = U)

又は一方で X 及び A かつ他方で C 及び G を交換することによる相補的配列から誘導される D N A 又は R N A 核酸配列を含む、請求項 2 に記載のプローブ。

6. 下記 B 15-11 配列：

10 20 30 40 50
AAGCTTCTTA AAAAGAGGXA CGGYTGAXXX XYCGXXAXXX XCGCXGAXXX
60 70 80 90 100
TGAXXXAGG XXXXXAGGCCX XGAXCXXCXA AGGCXGCGAG XXXAXAAAACG
110 120 130 140 150
CAACXAAAAA XAGGAXCGCX XGAAGCAGXG AXCAAXCXXX CGCCXACACC
160 170 180 190 200
AAAGAYAXCXA XAGGXGCA XGGXGAXXX GAGGXXXXXA AXACXCCACXX
210 220 230 240 250
CAXCAAGGGC GXXAGAAACX XAGXAXXXAG AXXXXXXGAAG XCCXGXXGA
260 270 280 290 300
XCAAGXXCXX GXCIGAAXXX CAACXCAAC XCAAGYAAAX XCCAGAAAC
310 320 330 340 350
XAXXCYGACA CGGCCXGAXXX GGATACCAAA XCCXXAAAC ACGXXAAACG
360 370 380 390 400
CAACXXXXAG XCCGCGXAXXX AGACAAACXAX AAGXAYCGAX CAAAAAAAC
410 420 430
GCAAGXXXXAG GAYAAAYCXX CACAXAAGCX X

又は一方で X 及び A かつ他方で C 及び G を交換することによる相補的配列を含む、請求項 4 又は 7 に記載のプローブ。

10. 配列 CCC XXX AXC XXX XAA CGG XXX GAG

(D N A 配列の場合 X = T ;
R N A 配列の場合 X = U)

又は一方で X 及び A かつ他方で C 及び G を交換することによる相補的配列を含む、請求項 6 又は 7 に記載のプローブ。

11. カンピロバクター・コリ又はジェジュニ種の細菌感染の選択的検出及び同定方法であつて、

請求項 1 に記載された C. コリ及び C. ジェジュニに各々特異的な 2 種のプローブを、同定されるべき株に属する、最初二重鎖の場合に必要であれば変性された相補的 D N A 配列又は相補的 R N A 配列と別々にハイブリッド形成させることを特徴とする方法。

12. カンピロバクターにより示される r D N A [その配列は下記：

(D N A 配列の場合 X = T ;
R N A 配列の場合 X = U)

又は一方で X 及び A かつ他方で C 及び G を交換することによる相補的配列から誘導される D N A 又は R N A 核酸配列を含む、請求項 3 に記載のプローブ。

7. 請求項 4 ～ 6 のいずれか一項に記載された配列から誘導される 15 ～ 35 、好ましくは 18 ～ 24 ネクレオチドの標識オリゴマー又は相補的オリゴマーにより構成される、請求項 4 ～ 6 のいずれか一項に記載のプローブ。

8. 配列 CCX XCG GXX CAC CGA GCX CCX G

(D N A 配列の場合 X = T ;
R N A 配列の場合 X = U)

又は一方で X 及び A かつ他方で C 及び G を交換することによる相補的配列を含む、請求項 4 又は 7 に記載のプローブ。

9. 配列 CCA XGC GXC CCX XXX CXC CGX AX

(D N A 配列の場合 X = T ;
R N A 配列の場合 X = U)

5'-XGA XCC GAC CGC AGG XAC XCC XX-3'

(X = T 又は U)

又は相補的配列である] の制限多型性をサザンプロットにより分析することからなる “R F L P” 法によってカンピロバクター属の細菌微生物の具体種を同定及び検出するための方法で有用な、請求項 1 に記載のプローブ。

13. 請求項 12 に記載されたプローブでの “R F L P” 法によるカンピロバクター属の細菌微生物の具体種の同定及び検出方法であつて、

1) 細菌の全 D N A を酵素 B g 1 II 又は 2 種の酵素 X h o I 及び B g 1 II で消化し：

2) 得られた D N A 断片をアガロースゲル電気泳動により分離し；しかし後

3) それらを変性し、ニトロセルロース又はナイロン膜上に移して固定し；

4) 上記膜からの上記断片とハイブリッド形成させるためにプローブを加える；

5) 検出されるプローブとハイブリッド形成された断片とそれらのサイズとの間の関係が下記の

特開平2-154700(3)

とおりである：

- ・カンピロバクター・ジェジュニは0.4%アガロースゲル中で3つのバンドを示す：
- ・4.6 kbに近い1つ、及び
- ・更に大きなサイズの2つのバンド
- ・カンピロバクター・コリは通常約0.8 kbのバンド及び場合により2.4 kbのバンド又は3.6 kbのバンドを示す：
- ・カンピロバクター・ラリジスは約2.4 kbのバンドを示す：
- ・カンピロバクター・フェツスは6 kbに近い二重のバンドを示す：
- ・カンピロバクター・アップサリエンシスは0.830 kb及び24 kbに近い二つのバンドを示す：ことを特徴とする方法。

3. 発明の詳細な説明

発明の背景

本発明の技術分野は、検出された単一DNA又はRNA核酸配列から構成されるプローブの分野

其又は食品中での同定のために優先して行われる。

発明の一般的説明

本発明は、カンピロバクター属（以下、C.と略記される）の細菌微生物の検出及び同定のための核酸プローブに関する。

更に正確には、本発明は、カンピロバクター属の様々な細菌種を特異的に検出及び同定するため有用な、各々検出されたDNA又はRNAの特定配列からなるDNA又はRNA核酸プローブに関する。特に、本発明はカンピロバクター・コリ種の特異的プローブ及びカンピロバクター・ジェジュニ種の他の特異的プローブに関する。

事実、腸炎の原因であるカンピロバクター種の中で、カンピロバクター・ジェジュニ及びカンピロバクター・コリは合わせてそのケースの99%を占め、一方C.ラリジス(C.laridis)及びC.フェツス(C.fetus)はそのケースのわずか1%を占めるだけである。C.コリに対するC.ジェジュニの比率は、80/20~50/50の割合で国毎に異なる。

に関する。

DNA-DNAハイブリッド形成は、分子生物学において必須の技術である。特に感染症の診断分野におけるヒトの健康に関してその可能性のある産業的用途は、広く認識されている。この具体的適用分野において、その方法は特異的同定手段としてDNAプローブ、即ち所定微生物に特異的な標識DNA断片の使用に依存している。

多くの微生物に関して現在医学的ルーチンで常用されている同定方法は、ある生化学試験に関連した“特異的な”培地中での培養に基づいている。これらの方では普通数日後になってやっと応答が得られ、しかも時々特異性の欠如によって役に立たなくなることがある。これは、先進国において急性細菌胃腸炎の主原因をなすカンピロバクター(Campylobacter)（ジェジュニ(jejuni)、コリ(colI)）の場合に特にあてはまる。

したがって、微生物検出のためのDNA-DNAハイブリッド形成技術の選択は、胃腸炎の原因であるカンピロバクター株のような病原体の

このように、本発明はカンピロバクター・コリ種の特異的プローブに関し、それは下記B267配列：

10	20	30	40	50
GATCAXCACC	AAAXCAGCX	XXAXAXAX	XAXAXAXACC	AAXXXCCXXA
60	70	80	90	100
GCAXXGCCAA	XXXGCACAGG	AGCXCCGXGA	ACCAAGGAA	AXXXGGCAGX
110	120	130	140	150
GAXXXCXXCA	GCXXXXXXGG	CAXXACAGG	AGXXAGGGAA	CGCAIXGGAA
160	170	180	190	200
CAACCAAXXXC	ACCGCXXA	ACXCCXACAC	XXXXGCAAGC	AAXAXXGGXX
210	220	230	240	250
XXAXACAGG	GCACAXXXGCA	XXAXXXGCA	AXAXGXXCXXA	XXXCXAAGGCC
260				
XXXXXCAAGX	AAAGCXX			

(DNA配列の場合 X = T ;

RNA配列の場合 X = U)

又は一方でX及びAかつ他方でC及びGを交換することによる逆相補的配列から誘導されるDNA又はRNA核酸配列を含むことを特徴とする。

プローブの好みの態様において、それらは上記配列B267から誘導される15~35、好みしくは18~24ヌクレオチドの標識オリゴマー

特開平2-154700(4)

又は相補的オリゴマーから構成される。特に、下記配列が挙げられる。：

CCX XXG CXX CAC CGA GCX CCX C
CCA XCC GXC CCX XXA CXC CXG AX

同様に、本発明はカンピロバクター・コリ種の特異的プローブとして下記B 8 1配列：

10 20 30 40 50
AAGGXXACGA XAXAAGCGAG XAXXAXAACG AXGAXXXGAX AGGXACCGA
60 70 80
CXGGGXXGIA GCCTTTCXXX XGAAGAAGCX Y

(DNA配列の場合 X = T)

(RNA配列の場合 X = U)

又は一方でX及びAかつ他方でC及びGを交換することによる相補的配列から誘導されるDNA又はRNA配列を含む核酸配列に関する。

有利には、これらのプローブは上記配列B 8 1から誘導される15~35、好ましくは18~24ヌクレオチドの標識オリゴマー又は相補的オリゴマーから構成される。

本発明はカンピロバクター・ジェジュニ種の特

好ましい態様において、本プローブは上記15~11配列から誘導される15~35、好ましくは18~24ヌクレオチドの標識オリゴマー又は相補的オリゴマーから構成される。特に、下記配列が挙げられる：

GCC XXG AXC X XC XAA GGC XGC GAG

したがって、カンピロバクター・コリプローブに関して2種(B 2 6 7及びB 8 1から誘導される)及びカンピロバクター・ジェジュニプローブに関して1種(15~11から誘導される)が選択された。これらのプローブによれば、コロニーハイブリッド形成、スポット上でのドットハイブリッド形成及び“サザン”ハイブリッド形成により、カンピロバクター・コリをカンピロバクター・ジェジュニから区別することができる。

サザンプロットハイブリッド形成により、150の異なるカンピロバクター株のDNAに対するこれらプローブの特異性及び感度が確認された。

核酸プローブは現状技術で周知であって、様々

異的プローブに關し、それは下記15~11配列：

10 20 30 40 50
AAGGXXACGA AAAXGAGGYA GGGXXGAYXX YXXGXXAXXX XCGCXGAGXX
60 70 80 90 100
XGAXXXYAGG XXXXXAGGCC XGAXCXXCA AGGCXGCCAG YXXAXAAACG
110 120 130 140 150
CAACXXAAAX XAGGAXXXGX XGAAGGAGXX AXCAAXXX CGCCXXACAC
160 170 180 190 200
AAAGAXAYCA AXAGGXGCAX XXXGXXICXX GAGXXXXXXA AXACXXCAAX
210 220 230 240 250
CAYCAAGGGC GXXAGAAACX AXGAXXXAC AXXXXXXGAG XCCYGCXXGA
260 270 280 290 300
ICAAGXXCXX GYCXGAXXXX CAACXXCAAC YXAAGYAAAX XXCCAGAATC
310 320 330 340 350
YAXXCYGACA CCGCCXXCXX GGAXACCAA YXXCXXAAAX ACXXXXAAICG
360 370 380 390 400
CAXXXXXAG XCCGXXAAGC AGACAAACXAX AAGXAXGAG CAAAAAAACA
410 420 430
GGAXXXXXXG GAXXAAAGXX CACAXAAGCX Y

(DNA配列の場合 X = T)

(RNA配列の場合 X = U)

又は一方でX及びAかつ他方でC及びGを交換することによる相補的配列から誘導されるDNA又はRNA核酸配列を含むことを特徴とする。

なルート、特に遺伝子工学又は直接的マニュアルもしくは自動合成によって得られる。

これらの核酸配列は、最初二重鎖である場合に必要であれば変性された相補的DNA又はRNA配列と関連する及びそれとハイブリッドを形成する性質を有している。この変性は、塩基性培地中でのインキュベート、培地温度の上昇、これら2プロセスの組合せ又は再度マイクロ波の作用によって行うことができる。

ハイブリッドの検出は、様々な方法によって行うことができる。本プローブは、核酸プローブの標識に関して当業者に公知の方法の1つによって標識される。例えばリン32で放射性同位元素標識されるか又はコールド(cold)プローブの場合には例えば酵素で非放射性同位元素標識されるが、これも公知である。あるケースでは、プローブは酵素で標識されないが、但し例えハイブリッド形成後に存在可能なビオチンで化学的に修飾される。

したがって、本発明の目的は、カンピロバクタ

特開平2-154700(5)

ー・コリ又はジェジュニ種の微生物のDNA又はRNAとのハイブリッド形成による上記種の細菌感染の選択的検出及び同定方法を提供することにもあるが、その場合においてC.コリ及びC.ジェジュニに各々特異的な本発明の2つのプローブが最初二重鎖である場合に必要であれば予め変性された同定されるべき株に属する相補的DNA又はRNA配列とハイブリッド形成されることを特徴とする。

最後に、本発明は、カンピロバクターにより示されるrDNA(リボソームRNAについてコードするDNA)の制限断片鎖多型性のザザンプロット法による分析からなる“RFLP法”によってカンピロバクター属の細菌微生物の具体種を同定及び特徴化するための方法で有用なプローブに関する記載が下記：

5'-XGA XCC GAC CCC AGG XCC XCC XA-3'
(X-T又はU)

又はその逆相補的配列であることを特徴とする。
特に適切なプローブでの“RFLP法”による

3. 6 kbのバンドを示す：

- カンピロバクター・ラリジスは約2.4 kbのバンドを示す：
- カンピロバクター・フェツスは6 kbに近い二重のバンドを示す：
- カンピロバクター・アップサリエンシス(C.upsaliensis)は0.830 kb及び2.4 kbに近い二つのバンドを示す。

本発明のプローブは、C.ジェジュニ及びC.コリ種に特異的なオリゴヌクレオチドプローブである。文献に記載されたカンピロバクタープローブと比較した場合のこれらプローブの主な特徴は、2つの主なカンピロバクター種(99%)：C.ジェジュニ及びC.コリの間で識別しうるそれらの能力である。最良のケースでも非常に遅くかつわずか85%の信頼度である従来の生化学試験と比べて、これらのプローブによれば迅速かつ正確な同定が可能である。

本発明によるプローブの特異性及び感度は、約150のカンピロバクター株及び約100種の共

カンピロバクター属の細菌微生物の具体種の同定及び特徴化方法は、以下のとおりであることを特徴とする：

1) 細菌の全DNAは酵素Bgl I又は2種の酵素Xba I及びBgl Iで消化される；

2) 得られたDNA断片はアガロースゲル電気泳動により分離される；しかる後

3) 変性し、ニトロセルロース又はナイロン膜上に移して固定する；

4) プローブが上記膜上の上記断片とハイブリッド形成させるために加えられる；

5) 検出されるプローブとハイブリッド形成される断片とそれらのサイズとの間の関係は下記のとおりである：

・カンピロバクター・ジェジュニは0.4%アガロースゲル中で3つのバンドを示す：

・4.6 kbに近い1つ、及び

・更に大きなサイズの2つのバンド

・カンピロバクター・コリは通常約0.8 kbのバンド及び場合により2.4 kbのバンド又は

生相に関して試験された。文献に現れるC.ジェジュニプローブはいずれも、多数のカンピロバクター株又は共生相種に関して試験されていなかった。文献に記載されたカンピロバクター・ジェジュニプローブは染色体DNA断片であるが、一方本発明のプローブは特定のオリゴヌクレオチドである。

医学的観点から、C.ジェジュニ及びC.コリ間の病原性の差異は明確に同定されなかった。更に正確には、この目的で行われた2つの疫学的研究では矛盾した結果が得られた〔ザ・ランセット(The Lancet), 1988年1月23日, 第176-77頁; ザ・ランセット, 1988年4月23日, 第942-43頁〕。この欠点は、従来の生化学試験(馬尿酸の加水分解試験)の結果の信頼性欠如及び解釈の困難性におそらく基づくであろう。

したがって、本発明は、生物学的試料中におけるC.ジェジュニ及びC.コリの選択的同定を可能にする手段(C.ジェジュニ及びC.コリオリ

特開平2-154700(6)

ゴヌクレオチドプローブ)、並びに異なるカンピロバクター種の迅速かつ信頼しうる同定を可能にするカンピロバクター株の分類方法(rDNAプローブによるRFLP技術)を提供する。

これらの手段及び方法は、異なるカンピロバクター種間の病原性の差異を臨床医が明らかにすることができるねばならず、ひいてはそれによって病原であるカンピロバクター種の関数として彼らが要治療性(therapeutic sanction)を示すことができねばならない。

欧州特許出願第232,085号明細書は、rRNAとハイブリッド形成しかつカンピロバクター属に特異的であるが但しカンピロバクター種を同定しないプローブについて記載している。

国際特許WO第86/44222号明細書は、非特徴化(非配列決定)染色体DNA断片であるプローブについて記載している。これらのプローブはカンピロバクター種に特異的でなく、しかもわずか80%の感度でしかない。

文献中に記載されたプローブ: カンピロバクタ

ー・ジェジュニ同定用の特異的DNAプローブ
〔V. コーリック(Y.Korlik)ら、ジャーナル・オブ・ゼネラル・マイクロバイオロジー(Journal of General Microbiology), 1988年,

第134巻、第2号、第521-9頁〕はC. ジェジュニに特異的でない。事実、奇詭なハイブリッド形成条件下であっても、あるC. コリはこのプローブとハイブリッド形成する(第3a図、4及び5列)。多数の共生相種と比較したこのプローブの特異性は、確認されていない。

文献中に記載されたプローブ〔C. ジェジュニに関する種特異的DNAプローブの分子クローニング、P. ピケン(P.Picken)ら、モレキュラー・アンド・セルラー・プローブス(Molecular and Cellular Probes), 1987年、第1巻、第3号、第245-59頁〕は、最少で1kbの染色体DNA断片である。これらプローブの配列は非公知である。これらのプローブの特異性は確認されていない。

「ゲノムDNAのサザンハイブリッド形成によ

るカンピロバクター種の同定」、ロマニウク(Romanuk)ら、FEMSマイクロバイオロジカル・レターズ(FEMS Microbiological Letters), 1987年、第43巻、第3号、第331-5頁に記載されたロマニウクにより用いられているRFLP法は、カンピロバクターに“特異的な”rRNAプローブに基づいている。用いられたプローブの配列は、本発明のプローブと異なる。

本発明のRFLP法に用いられるプローブの配列は、大腸菌(Escherichia coli)の配列から誘導される。したがって、このプローブはカンピロバクタータイプに特異的でないが、但しその性質(大腸菌及びカンピロバクター・ジェジュニに共通して保存された配列)からそれは非常に高感度である(n=150に関して感度100%)。このプローブは、カンピロバクター(ジェジュニ、コリ、ラリジス、フェツス、アップシアレンシス)の具体種の同定を上記種のrDNAのXba I・Bgl II RFLPの分析によって可能にする。

この論文に記載されたロマニウクの方法では、

C. コリ及びジェジュニ間の識別が通常不可能である(第1C図、1及び6列)。

記載されたプローブは全体的に異なるデザインであって、用いられた制限酵素は異なりかつ制限特性も異なる。

本発明の他の利点及び特徴は、下記記載から明らかとなるであろう。

下記記載は、添付図面の第1~6図を参考にしてなされている。

第1~3図は、カンピロバクターの外膜のタンパク質の特性に関するポリアクリルアミドゲル分析について示している。それは、カンピロバクターから得られる外膜タンパク質(OMP)のSDS-PAGE電気泳動(クマシーブルーで染色、14~20%勾配)に関する。各列下の数値は、株を示す。カラムM: キロドルトンによるタンパク質の標準分子量。CcはC. コリに特徴的なOMPタンパク質を示す。CjはC. ジェジュニに特徴的なOMPタンパク質を示す。

第4図は、酵素Xba I/Bgl IIで開裂され

特開平2-154700(7)

かつ下記配列:

5'-TGA TCC GAC CGC ACG TTC TCC TA-3'
 の 16S rDNA に相補的なプローブとハイブリッド形成されたカンピロバクターのゲノムDNA の "ササンプロット" による分析結果について示している。パネルA: カンピロバクター・コリ (株番108、212、80、82、85、87、89、90)、カンピロバクター・ジェジュニ (株番106、83、84、96、8、95、2、3、88)、カンピロバクター・フェツス (株番1) 及びカンピロバクター・ラリジス (株番116) のDNAが組合せ酵素Xba I - Bgl I IIで消化された。写真上の数値は様々な株に対応する。DNA断片はナイロン膜に移された。膜は³²Pで標識されたrDNAプローブとハイブリッド形成された。分子量標準はλファージの Hind III消化である (列M: 写真横の数値は分子量参照の断片のサイズに相当する)。パネルB: 参照株のDNAは酵素Xba I 及びBgl I IIで消化され、パネルAで記載されているように分析さ

れた。

MBLG株
 2 C. ジェジュニ
 3 C. ジェジュニ
 8 C. ジェジュニ
 46 C. ジェジュニ
 83 C. ジェジュニ
 84 C. ジェジュニ
 88 C. ジェジュニ
 95 C. ジェジュニ
 96 C. ジェジュニ
 203 C. ジェジュニ
 9 C. コリ
 80 C. コリ
 82 C. コリ
 85 C. コリ
 87 C. コリ
 89 C. コリ
 90 C. コリ

参照株

1 C. フェツス
 106 C. ジェジュニ Iリオール(Lior) 4
 208 C. ジェジュニ NCTC 11848
 108 C. コリ リオール 1
 211 C. コリ リオール 44
 212 C. コリ リオール 8
 116 C. ラリジス リオール 34
 195 C. ラリジス NCTC 11352
 170 C. アップサリエンシス NCTC 11541
 (MBLG: ルヴェンのカトリック大学における微生物研究所の略)
 第5及び6図は、カンピロバクターのゲノムDNAのササン分析結果について示している。
 第5図: 酵素 Hind IIIで消化されかつプローブ 15-11とハイブリッド形成されたカンピロバクターのゲノムDNA分析
 第6図: 酵素 Hind III / Sau 3Aで消化されかつプローブ B 267とハイブリッド形成されたカンピロバクターのゲノムDNA分析

好みしい態様の説明

下記態様は例示であって、限定のためと解釈されるべきではない。

例1: 株の分類

本発明の第一ステップは、カンピロバクターコレクションの確立及び後者の株の分類であった。これらのステップは、後に単離されたプローブの特異性及び選択性の決定のために不可欠であった。

従来の細菌学において、C. コリ及びC. ジェジュニの識別は馬尿酸試験の加水分解に唯一基づいている。現在この生化学試験は、最良の場合でもわずか8.5%の信頼度であると通常認識されている。したがって、株の分類のために2つの異なるアプローチに従うことが決定された: 1) 第一是異なる種の全DNA間の相同率に基づく; 2) 第二是カンピロバクター外膜のタンパク質の特性に関するポリアクリルアミドゲル分析である (第1~3図参照) (外膜タンパク質のSDS-PAGE)。

これら2つの方法から得られた結果 (下記第1

特開平2-154700(8)

表) は、分析された 25 の株について完全に一致している。

第 1 ~ 3 図において、下記株が用いられている：

第 1 図：116 C. ラリジス I リオール 34

I C. フェツス

108 C. コリ リオール 1

106 C. ジュジュニ I リオール 4

46 研究所で単離された株

90 ベルギー、ブラックセルのセントラッククリニックで単離された株

第 2 図：3-8-83-84-88-92-95-2-55-78-79-81-86-96：ベルギー、ブラックセルのセントラッククリニックで単離された株

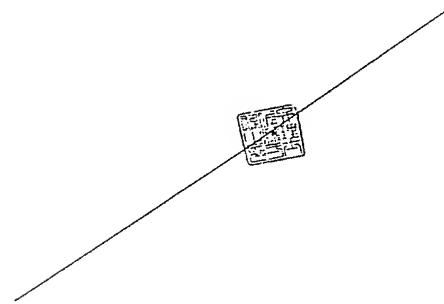
第 3 図：9-80-82-85-87-89-90 及び 108：ベルギー、ブラックセルのセントラッククリニックで単離された株

第 1 ~ 3 図の分析では、各々 Cj OMP 55 (分子量 55 kDa)、Cj OMP 37 (分子量 37 kDa)、Cc OMP 84 (分子量 84 kDa) 及び Cc OMP 37 (分子量 25 kDa) と命名され

たカンピロバクター・ジュジュニの 2 種の特異的タンパク質及びカンピロバクター・コリの 2 種の特異的タンパク質の存在について示している。したがって、これら 4 種のタンパク質は、C. コリ及び C. ジュジュニのこれら 4 種の特異的タンパク質に対する循環抗体を調べるために、これらタンパク質の特異的抗体の使用、これらのタンパク質に相当する合成ペプチドの使用又はこれらタンパク質についてコードする遺伝子もしくは mRNA に特異的な DNA / RNA プローブの使用のいずれかに基づきカンピロバクターを分類する診断試験の確立のために役立つ。

これら 25 の株は、r DNA (リポソーム RNA についてコードする DNA) の RFLP (Xba I - Bgl II) に基づくカンピロバクターの同定方法の開発のための参照株として機能した。カンピロバクターの r DNA の高度に保存された領域とハイブリッド形成する配列 5'-TGA TCC GAC CGC AGG TTC TCC TA-3' のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いることにより、この方法

はサザンプロットによるこの属の様々な種の同定を可能にしうる。我々のコレクションの 150 株は、この方法により同定された。これら同一の 150 株は、本発明によるカンピロバクター用のプローブ (プローブ "B 267" 及び "15-11") の特異性及び選択性の決定のために用いられた。しかもこの研究結果は、C. コリ種が想定された従来の試験の場合よりもベルギーにおいて (約 16%) 良好に確認されうることを示している。



第 1 図：馬尿酸の加水分解試験、OMP 特性及び全 DNA の相間率によるカンピロバクター・ジュジュニ及びカンピロバクター・コリ間の鑑別

参考株	馬尿酸の 加水分解 特性	下記株との相間率		
		1 C. フェツス	106 C. ジュジュニ I リオール 4	108 C. コリ リオール 1
I C. フェツス	n.a.	F	29%	59%
106 C. ジュジュニ I リオール 4		+	J	100% (R)
108 C. コリ リオール 1		n.a.	n.a.	65%
208 C. コリ リオール 1		-	C	31%
211 C. コリ リオール 44		-	C	29%
212 C. コリ リオール 8		-	C	39%
116 C. ラリジス リオール 34		n.a.	n.a.	14%
195 C. ラリジス NCTC 11352		n.a.	n.a.	22%
				11%

2	115%	21%
3	100%	36%
8	79%	28%
9	47%	92%
46	104%	28%
60	32%	69%
82	43%	95%
83	107%	35%
84	77%	31%
85	38%	83%
87	41%	91%
88	77%	34%
89	38%	79%
90	43%	99%
95	125%	46%
96	94%	39%
203	109%	33%

上段された様

% v/v β -メルカプトエタノール、41% ドデシル硫酸ナトリウム、15% v/v グリセロール、0.01% プロモフェノールブルー) 200 μ l 中に回収された OMP (ペレット) を保存のため -20°C に凍結するか、又は変性用培地の勾配 (14 ~ 20%) 中垂直ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析 (SDS-PAGE, アクリルアミド・ビスマクリルアミド 29:1, 0.4% SDS) のために沸騰水浴中で 5 分間没漬する。分析容量は 30 μ l であって、移動は 1.5 mA の一定電流下で 16 時間行われた。タンパク質をクマシーブルーで染色することにより展開した。

図 1 B

rDNA の制限多型性 (RFLP) に基づくカンピロバクターの分類技術に関する説明

全 DNA (1 ~ 2 μ g) を制限緩衝液 (37.5 mM トリス HCl, 9.5 mM MgCl₂, 1.25 mM DTT, 1.25 mM NaCl, 2.25 μ g/ml BSA; pH 7.5) 4.0 μ l 中 37°C で 8 ~ 16 時間にわたり各々

特開平2-154700 (9)

例 1 A

カンピロバクターの外膜タンパク質 (OMP) の調製及び分析

嫌気性雰囲気下 [ガスパック・アナエロカルト C メルク (Gaspack anaerocult C Herck)] 37°C で 48 時間の培養後、細菌を pH 7 の 0.001 M リン酸緩衝液中に再懸濁する。それらの濃度を 1.0 CPU/ml に調整する (CPU = コロニー形成単位)。

これらの懸濁液を超音波で 2 分間破壊処理し (超音波処理器ブランソン B 12 (Branson B12)), しかる後アリコート 3 ml 当たり 5000 g で 20 分間遠心分離する。懸濁液を 33,000 g で 90 分間再度遠心分離する。ペレットをラウリルサルコシン酸ナトリウム 2% 含有の pH 7 の 0.001 M リン酸緩衝液 2 倍容量と再懸濁後追加の蒸留水 0.5 ml に再懸濁する。室温で 30 分間攪拌 (150 rpm) 後、この混合物を 33,000 g で 90 分間遠心分離する。サンプル緩衝液 (pH 6.8 の 50 mM トリス HCl, 5

J-カンピロバクター・ジュニエ C-カンピロバクター・コリ F-カンピロバクター・フェヌス n.a.-同定不能 n.t.-試験せず n.i.-用いられた際結果に用いられた際結果

2.0 単位の制限酵素 Xba I 及び Bgl II と共にインキュベートした。反応をフィコール (Picoll) (ファルマシア (Pharmacia)) 30% 及びプロモフェノールブルー 0.25% 含有 1.0 × TBE (1 × TBE = 0.05 M トリス HCl, 0.05 M ホウ酸、0.001 M EDTA; pH 8.3) 5 μ l の添加により停止させた。DNA 断片を臭化エチジウム 1 μ g/ml 含有 1 × TBE 中 0.8% アガロースゲル (シーケム (Seakem); FMC) 上で分離した。臭化エチジウム 0.1 μ g/ml 含有 1 × TBE 中 2.5 mA で 16 時間電気泳動後、DNA を脱ブリニ化するためゲルを 0.25 N HCl 沐中に 15 分間没漬した。次いで、ゲルを 0.5 M NaOH - 1.5 M NaCl に 30 分間及び 0.5 M トリス HCl (pH 7.5) - 1.5 M NaCl に 30 分間連続的に没漬した。移動用緩衝液として 1.0 × SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M クエン酸三ナトリウム) を用いることにより、DNA 断片をゲルからナイロン膜 (ハイボンド - N

特開平2-154700 (10)

(Hybond-N) : アマーチャム (Amersham) に移した。膜を $2 \times SSC$ で 15 分間洗浄し、1 分間乾燥し、DNA を UV (312 nm) 照射により膜に固定した。

次いで、膜を粉乳 1% (ネッスル (Nestle) のグロリア (Gloria)) 、 SDS 2% (ドデシル硫酸ナトリウム) 及び子牛胸腺由来変性DNA (サーバ (Serva)) $20 \mu g/ml$ 含有 $6 \times SSC$ 中 50°C で 2 時間前ハイブリッド形成させた。次いで、膜をプローブ ORJ $16 Sa 10^6 dpm/ml$ 含有の同一緩衝液 ($25 \mu l/ed$) 中でハイブリッド形成させた。プローブの末端標識化は、ワレス (Wallace) の方法に従い基質として α - [^{32}P]-ATP を用い T4 キナーゼで行われた。

50°C で 16 時間インキュベート後、膜を 50°C において $2 \times SSC$ - SDS 1% 緩衝液で 15 分間にわたり 3 回洗浄した。

膜を風乾し、-80°C で 16 ~ 48 時間にわたり能力スクリーンでオートラジオグラフィーに付した (マニアティス (Maniatis) ら、1982 年)。

本発明によれば、各々の種の特異的クローニングを示差のハイブリッド形成により可能にするプロトコールが完成された。我々のプロトコールによれば、ゲノムバンクの各クローニングの 3 つのコピーを、C. コリ、C. ジェジュニ及び C. ラリジスの全DNA と各々ハイブリッド形成させた。各バンクについて、相同的全DNA (即ち、それらが由来するDNA) とハイブリッド形成するが他の 2 つの非相同種の全DNA とハイブリッド形成しないクローニングが得られた。これらクローニングの各々のプラスミドDNA を精製し、上記のように再試験した。これら 2 つのスクリーニングステップで選択されたクローニングを、例 1 で記載のように特徴付けられる 25 のカンピロバクター株からの全DNA とハイブリッド形成させた。この試験で最も選択性かつ最も特異的なクローニング (本発明では 15-11、B267 及び B81 と呼ばれる) は、ハイブリッド形成コロニーによる 4 回目のスクリーニングで得られた。25 のカンピロバクター株をカンピロバクターについて選択性の培地に

例 2 : プローブ源

DNA 源はカンピロバクターのゲノムDNA であった。C. ジェジュニ及び C. コリ株からの全DNA を Sau3A 制限酵素で部分的に開裂し、約 4 kb の DNA 断片を得た。C. ジェジュニの異なる制限断片をベクター pBR322 でクローニングし、C. コリの断片をベクター pUC9 でクローニングし、各々の種のゲノムバンクを得た。C. コリ及び C. ジェジュニプローブをこれらのバンクから単離した。

例 3 : プローブの選択性

プローブの質の評価を可能にする 2 つの基準が存在する: 特異性及び選択性。プローブが種に特徴的である場合には、特異性とはこの種に属する株のDNA (又は RNA) とのみハイブリッド形成するこのプローブの性質をいう。このようなプローブの選択性とは、この種のすべての株のDNA (又は RNA) とハイブリッド形成するこのプローブの能力をいう。

例 4 : ゲノムバンクのスクリーニング

置かれた 2 種のナイロン膜 (アマーチャムのハイボンド・N) 上で培養した。製作者の勧めに従う膜の培養及び処理の後、1 種の膜はプローブ B267 とハイブリッド形成し、他はプローブ 15-11 とハイブリッド形成した。

C. コリ又は C. ジェジュニとして分類されたすべての株は、各々 B267 又は 15-11 と更に強くハイブリッド形成した。C. フェツス又は C. ラリジスとして分類された株は、2 つのプローブと更に弱くかつ同一にハイブリッド形成した。

例 5 : プローブの特異性及び感度の測定

プローブの特異性及び感度の試験は、コロニー上のハイブリッド形成又はスポット上のドットハイブリッド形成のいずれかで通常行われる。最初のケースでは、プローブはDNA を精製することなく多数の株とハイブリッド形成される。株のDNA が精製される場合には、特異性及び感度に関する試験はドットハイブリッド形成又は "サザンプロット" により行うことができる。

プローブ B267 又は 15-11 の特異性 (カ

特開平2-154700(11)

ンビロバクター属に属する) 及び感度の試験は、カンビロバクターの制限多型性のサザンプロットによる分析に依存している。この技術は、プローブの感度を確認しうる能力以外にも、分析される各株に関してプローブとハイブリッド形成するゲノムDNAの1以上の断片のサイズを示すことによりその特異性を強調する特徴を有している。

プローブB 267又は15-11の特異性に関する試験は、既に分類された150のカンビロバクター株からのゲノムDNAのサザンハイブリッド形成により行われた。

プローブの場合と等しいサイズ(第5図)のHind III断片レベルすべてのC. ジェジュニ株のDNAとハイブリッド形成するC. ジェジュニプローブ(クローン15-11から得られる431bpのHind III断片)がこうして選択された。このプローブは、他の種の株のDNAとハイブリッド形成しない。C. ジェジュニ種に属するこのプローブに関して制限多型性(制限断片長さ多型性)は存在しないようである。これは、我々

のプローブがC. ジェジュニ種の特異的な保存領域を認識しうることを示している。

第5図で再現された実験の場合、カンビロバクター・コリ(株211及び108)、カンビロバクター・ラリジス(株195及び116)、カンビロバクター・フェツ(株1)及びカンビロバクター・ジェジュニ(株208~2;カラム7~18)のDNA 2μgをHind IIIで消化した。C. ジェジュニの特異的プローブをビオチン化させた。Hind IIIで消化されたλDNAを分子量マーカーとして用いる(カラムM)。Hind IIIで消化された非標識ベクター・プローブを陰性コントロールとして用いた(カラムC)。

C. ジェジュニプローブと同一の特異的特性を有する2つのC. コリプローブも単離された。それらは81bpのHind III断片(プローブB 81)及び267bpのHind III-Sau 3A(プローブB 267)からなる。後者は、267bpのHind III-Sau 3A断片レベルすべてのC. コリ株のDNAとハイブリッド形成する。このブ

ローブは、他の種の株のDNAとハイブリッド形成しない(第6図)。

第6図で示された実験の場合、カンビロバクター・コリ(株89、82、90、80、212、211及び108)、カンビロバクター・フェツ(株1)、カンビロバクター・ラリジス(株116)及びカンビロバクター・ジェジュニ(株96、95、208)のDNA 2μgをHind III-Sau 3Aで消化した。C. コリの特異的プローブ(B 267)をビオチン化させた。Hind IIIで消化されたλDNAを分子量マーカーとして用いた(カラムM)。非標識電気溶出プローブ(100pg)を陽性コントロールとして用いた(カラムC⁺)。

C. コリプローブB 81の特異性及び感度も確認された。

例6: サブクローニング及び配列決定

選択されたプローブを1本鎖ファージベクターM13でサブクローニングし、ヌクレオチド配列を決定した。

例7: プローブの特異性及び感度の測定

OCC267a及びOCC267bと呼ばれるプローブB 267に相当する2つのオリゴヌクレオチド並びにプローブ15-11に相当するオリゴヌクレオチド(OCT1511aと呼ばれる)を合成し、スポット上のドットハイブリッド形成及びコロニーハイブリッド形成に関して試験した。115のカンビロバクター株(C. ジェジュニ96及びC. コリ19)とこれらプローブとのドットハイブリッド形成及びコロニーハイブリッド形成に基づく特異性及び感度の計算結果は、下記表でまとめられている:

	特異性	感度
OCC267a	97%	100%
OCC267b	97%	95%
OCT1511a	95%	100%
OCC267a		
配列: 5'>CCT TTG GTT CAC GGA GCT CCT G<3'		
22塩基		
OCC267b		

特開平2-154700 (12)

配列: 5'>CCA TGC GTC CCT TTA CTC CTG AT<3'

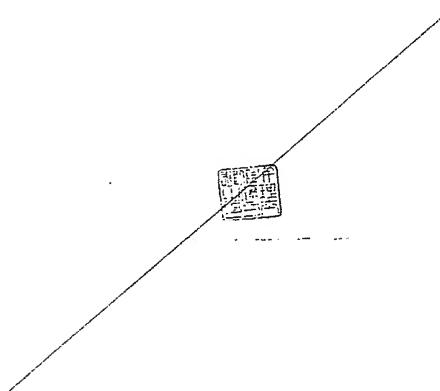
23塩基

O C J 1 5 1 1 a

配列: 5'>GCC TTG ATC TTC TAA GCC TGC CAG<3'

24塩基

これらのオリゴヌクレオチドは、下記市販物の
株とハイブリッド形成しない。下記株はコロニー
ハイブリッド形成により試験された：



1. 腸内細菌

- エンテロバクター・エロゲネス(*Enterobacter aerogenes*)
- エンテロバクター・アグロメラ ns(*Enterobacter agglomerans*)
- エンテロバクター・クロアカエ(*Enterobacter cloacae*)
- ハフニア・アルベイ(*Haefnia alvei*)
- アルカレスセンス・ジスパー(*Alcalescens dispar*)
- サルモネラ・チフィー(*Salmonella typhi*)
- サルモネラ・バラ・チフィーA(*Salmonella para typhi A*)
- サルモネラ・バラ・チフィーB(*Salmonella para typhi B*)
- サルモネラ・インファンチスC(*Salmonella infantis C*)
- サルモネラ・エンテリチジスD(*Salmonella enteritidis D*)
- プロテウス・ブルガリス(*Proteus vulgaris*)
- プロテウス・ミラビリス(*Proteus mirabilis*)
- プロテウス・モルガニイ(*Proteus morganii*)
- シトロバクター・フレウンジイ(*Citrobacter freundii*)
- シトロバクター・アマロナチクス(2)(*Citrobacter amalonaticus(2)*)
- シトロバクター・ジベルサス(*Citrobacter diversus*)
- プロビデンシア・レットゲリ(*Providencia rettgeri*)
- プロビデンシア・アルカリファシエンス(*Providencia alkalifaciens*)
- プロビデンシア・スツアルトイ(*Providencia stuartii*)

セラチア・リクエファシエンス(*Serratia liquefaciens*)
セラチア・マルセッセンス(*Serratia marcescens*)
エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)
エドワードシエラ(*Edwardsiella*)
クレブシエラ・オキシトカ(*Klebsiella oxytoca*)
クレブシエラ・ニューモニアエ(*Klebsiella pneumoniae*)
クレブシエラ・エロゲネス(*Klebsiella aerogenes*)
シゲラ・フレクスネリ(*Shigella flexneri*)
シゲラ・ソネイ(*Shigella sonnei*)
シゲラ・ジセンテリアエ(*Shigella dysenteriae*)
シゲラ・フレクスネリ1(*Shigella flexneri 1*)
シゲラ・フレクスネリ1 a
シゲラ・フレクスネリ2 a
シゲラ・フレクスネリ4 a
シゲラ・フレクスネリ6
シゲラ・ボイジイ1(*Shigella boydii 1*)
シゲラ・ボイジイ2
シゲラ・ボイジイ1 4
シゲラ・ジセンテリアエ2(*Shigella dysenteriae 2*)
シゲラ・ジセンテリアエ3

イエルシニア・エンテロコリチカ W22703(*Yersinia enterocolitica* W22703)
イエルシニア・エンテロコリチカ E439:80 CaD 0:9
イエルシニア・エンテロコリチカ E439:80 CaI 0:9
イエルシニア・エンテロコリチカ 708-82 CaD 0:5,27
イエルシニア・エンテロコリチカ W22708 CaD 0:9
イエルシニア・エンテロコリチカ W22708 CaI 0:9
イエルシニア・エンテロコリチカ W838 CaD 0:5,27
イエルシニア・エンテロコリチカ E104/81 CaI 0:10
イエルシニア・エンテロコリチカ W845 CaD 0:3
イエルシニア・エンテロコリチカ IP38 CaD 0:2
イエルシニア・エンテロコリチカ T1758 CaD 0:5
イエルシニア・エンテロコリチカ J35 CaI 0:5
イエルシニア・エンテロコリチカ E334/80 CaI 0:0,30
イエルシニア・エンテロコリチカ W852 CaI 0:47
イエルシニア・エンテロコリチカ IP106 CaI 0:7,8
イエルシニア・エンテロコリチカ E301-82 CaI 0:41

2. 離気性菌

クロストリジウム・ジフィシル(*Clostridium difficile*)
クロストリジウム・スブテルミネール(*Clostridium subterminalis*)
クロストリジウム・スプロゲネス(*Clostridium sporogenes*)

クロストリジウム・ビフェルメンタヌス(*Clostridium bif fermentans*)
 フソバクテリウム・ヌクレアクタム(*Fusobacterium nucleatum*)
 フソバクテリウム・モルチフェラム(*Fusobacterium mortiferum*)
 バクテロイデス・フラギリス(*Bacteroides fragilis*)
 3. グラム陽性球菌
 エンテロコッカス・ファエカリス(*Enterococcus faecalis*)
 エンテロコッカス・ファエシウム(*Enterococcus faecium*)
 ストレプトコッカス・ボビス(*Streptococcus bovis*)
 ストレプトコッカス・ミレーリ(*Streptococcus milleri*)
 スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)
 4. オキシダーゼ⁺
 アエロモナス・ヒドロフィラ(*Aeromonas hydrophila*)
 プレシオモナス(*Plesiomonas*)
 ピブリオ・コレラエ(*Vibrio cholerae*)
 ピブリオ・アルギノリチカス(*Vibrio alginolyticus*)
 5. 非培養
 シュードモナス・エルギノサ(*Pseudomonas aeruginosa*)
 シュードモナス・フルオレッセンス(*Pseudomonas fluorescens*)
 シュードモナス・マルトフィリア(*Pseudomonas maltophilia*)
 アルカリゲネス・ファエカリス(*Alcaligenes faecalis*)

特開平2-154700(13)

アルカリゲネス・デニトリフィカンス(*Alcaligenes denitrificans*)
 アシネトバクター(*Acinetobacter*)
 6. プラスミド含有エシェリヒア・コリ
 28TAM1 (Col VBM260)
 CGSC 6059 (F)
 711 (p307)
 3272 (pGC1)
 J53 (pGC200)
 J53 (RP4)
 J53 (Rsa)
 C600 (RSF1010)
 7. カンピロバクターコントロール
 カンピロバクター・フェツス(株1)
 カンピロバクター・ラリジス(株116)
 カンピロバクター・ラリジス(株195)
 カンピロバクター・アップサリエンシス(株170)

操作方法:

既に分類された115のカンピロバクター株(10^7 細胞/株)をカンピロバクター用の選択培地に置かれた3種のナイロン膜(アマーチャムのハイボンド-N)上で培養した。微好気性雰囲気下42°Cで16時間の培養後、膜を風乾し、1N NaOH-20% EtOH緩衝液に15分間、1MトリスHCl緩衝液(pH7.5)に3×1分間逆洗的に入れた。膜を30分間風乾し、細菌のDNAをUV光(312nm)により膜に固定した。次いで、膜を牛乳1% (ネッスルのグロリア)、SDSO.1%及び子牛胸腺由来変性DNA(サーバ)20μg/ml含有2×SSC中60°Cで1時間前ハイブリッド形成させた。次いで、各膜を3種のプローブOCC267a、OCC267b又はOCC1511a 10^6 dpn/mlの1つを含有した同一組成の緩衝液中でハイブリッド形成させた。プローブの末端標識化は、ワレスの方法に従いT4キナーゼ及び γ -[³²P]ATPを用いて行われた。60°Cで16

時間インキュベート後、各膜を60°Cにおいて2×SSC-0.1%SDS緩衝液で10分間にわたり3回洗浄した。膜を風乾し、-80°Cで16時間にわたりオートラジオグラフィーに付した。

各プローブとカンピロバクター115株とのハイブリッド形成結果を、これらの株のrDNAのXhol-I-Bgl-II-RFLP分析によるこれら115株の分類結果と比較した。

下記表は、試験された115株に関するプローブOCC267bの特異性及び感度の計算値について示している。

	RFLP分析により 同定されたC. コリ		
	+	-	
プローブOCC267b	+	18 3	21
とのハイブリッド形成	-	1 93	94
		19 96	115

感度: 18/19×10 = 95%

特異性: 93/96×100 = 97%

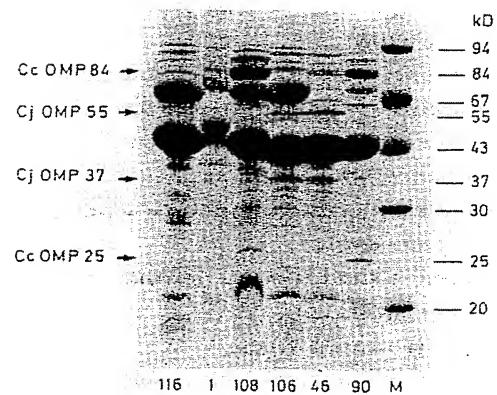
特開平2-154700(14)

4. 図面の簡単な説明

第1～3図は、カンピロバクターの外膜のタンパク質の特性に関するポリアクリラミドゲル分析について示している写真である。

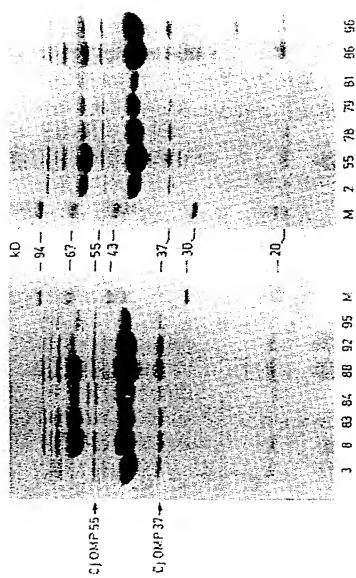
第4図は、酵素X h o I / B g I IIで脚型されかつ16S rDNAに相補的なプローブとハイブリッド形成されたカンピロバクターのゲノムDNAの“サザンプロット”による分析結果について示している写真である。

第5及び6図は、カンピロバクターのゲノムDNAのサザン分析結果について示している写真である。

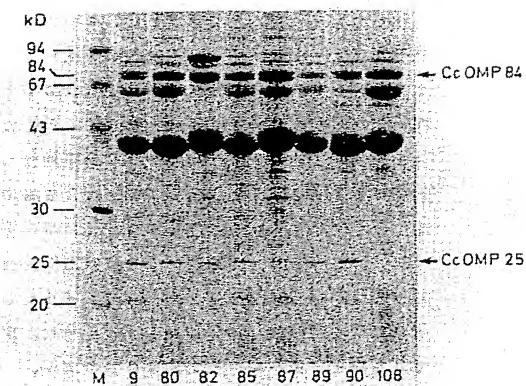


第1図

出願人代理人 佐藤一雄



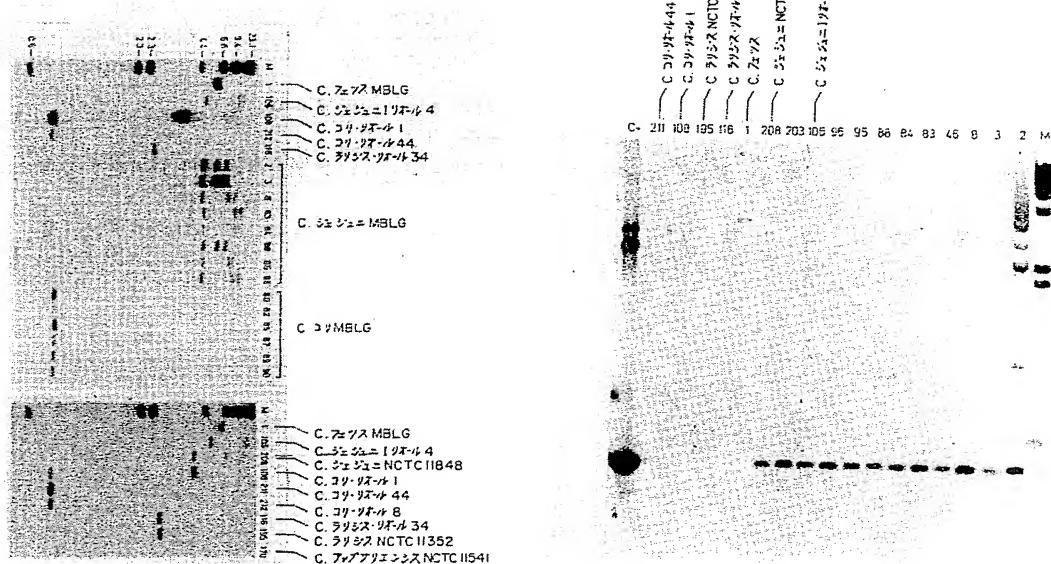
第2図



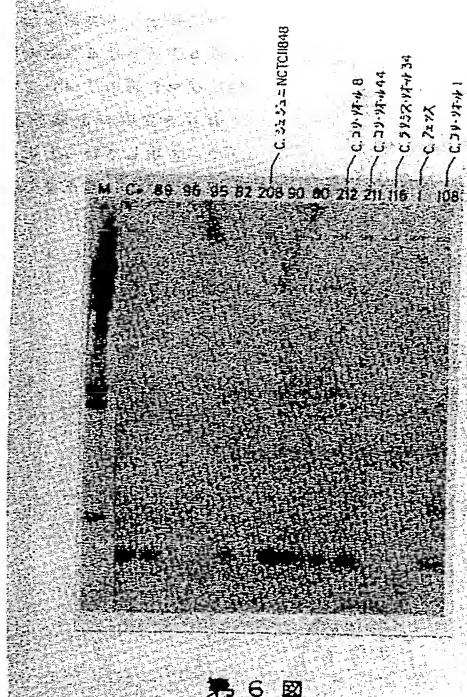
第3図

特開平2-154700 (15)

図4



第5図



第6図

特開平2-154700 (16)

第1頁の続き

⑤Int. Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号
// C 12 Q 1/10		6807-4B
G 01 N 33/569	F	7906-2C
33/60	A	7055-2C

⑥発明者 イザベル、デルクレ ベルギー国ブリュッセル、ショーセ、ドウ、ラ、ウルブ、
184 (ペーテー、6)

⑦発明者 イザベル、デロ ベルギー国リクザンサール、アブニユ、マルセル、テイル
カン、5

⑧発明者 ギ、コルネリ ベルギー国クラーイネム、アブニユ、デ、コンバタン、2
ビス

手 纸 换 正 書 (方式)

平成 1 年 11 月 20 日

特許庁長官 吉田文毅殿

1 事件の表示 平成 1 年特許第 173882 号

2 発明の名称 カンピロバクター属の異なる細菌種を特異的に検出するために有用な核酸プローブ

3 换正をする者 事件との関係 特許出願人
イエルエ・メドジエニックス、ソシエテ、
アノニム

4 代理人 (類似番号 100)
東京都千代田区丸の内三丁目2番3号
(電話東京 (211)2321 大代表)
6428 井理士、佐藤一

5 换正命令の日付 発送日 平成 1 年 10 月 31 日

6 换正の対象 頭書の出願人の欄、委任状及び明細書の
「図面の簡単な説明」の欄

7 换正の内容 1 別紙の通り

2 明細書第 51 頁第 4 行に「ついて示している」とあるを「おける生物の形態を示す」に、第 8 行及び第 9 行に「ついて示している」とあるを「おける生物の形態を示す」に、第 11 行に「ついて示している」とあるを「おける生物の形態を示す」に補正する。

特許庁
1.12.1